

1651

ANNALES ACADEMIAE SCIENTIARUM FENNICAE

Series A

II. CHEMICA

107

GLUCOBRASSICIN, DER PRECURSOR VON
SCN⁻, 3-INDOLYLACETONITRIL UND
ASCORBIGEN IN BRASSICA
OLERACEA SPECIES

VON

ROLF GMELIN und ARTTURI I. VIRTANEN

Biochemisches Forschungsinstitut der Stiftung für chemische Forschung,
Helsinki, Finnland



HELSINKI 1961
SUOMALAINEN TIEDEAKATEMIA

SUOMALAISEN TIEDEAKATEMIAN TOIMITUKSIA
ANNALES ACADEMIAE SCIENTIARUM FENNICAE

SERIES A. II. CHEMICA

Redactor: Prof. Dr. A. I. VIRTANEN
Kalevankatu 56 b, Helsinki

ANNALES ACADEMIAE SCIENTIARUM FENNICAE

Series A

II. CHEMICA

107

GLUCOBRASSICIN, DER PRECURSOR VON
SCN⁻, 3-INDOLYLACETONITRIL UND
ASCORBIGEN IN BRASSICA
OLERACEA SPECIES

ROLF GMELIN und ARTTURI I. VIRTANEN

Biochemisches Forschungsinstitut der Stiftung für chemische Forschung,
Helsinki, Finland

HELSINKI 1961
SUOMALAINEN TIEDEAKATEMIA

Vorgelegt am 12 Mai 1961

KESKUSKIRJAPAINO
HELSINKI 1961

Glucobrassicin, der Precursor von SCN^- , 3-Indolylacetonitril und Ascorbigen in *Brassica oleracea* species*

Verschiedene, scheinbar getrennt stehende Wirkstoffgruppe haben immer wieder die Aufmerksamkeit von Phytochemikern, Pflanzenphysiologen und Medizinern auf die als Gemüse- und Futterpflanzen wichtigen Vertreter der Gattung *Brassica* gelenkt: die strumigenen »Brassica-Faktoren«²³, die heteroauxinartigen Wuchshormone²⁵, Ascorbigen^{13, 32}, Geruchs- und Geschmacksstoffe etc.

Die Meldungen von CLEMENTS und WISHART¹, dass die Milch von Kühen nach Fütterung mit Markstammkohl strumigene Stoffe in Konzentrationen enthält, die auch für den Menschen strumigen wirken sollen, haben das allgemeine Interesse für die Brassica-Faktoren erneut erweckt. Seit einigen Jahren wird auch in diesem Laboratorium dieses wichtige Problem bearbeitet. Über das Auftreten von Vinylthiooxazolidon in *Brassica oleracea* species^{2, 3} und seinen Übergang in Milch² wurde bereits berichtet.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Isolierung und den chemischen Eigenschaften eines neuen Thioglucosids aus *Brassica oleracea* species sowie seiner Rolle als Vorstufe der obengenannten Wirkstoffgruppen.

Unsere ursprüngliche Beobachtung, dass in gewissen Cruciferen Senfölglycoside enzymatisch in Thiocyan Säureester gespalten werden⁴, die bei Versuchstieren eine beträchtliche Erhöhung der Serum- SCN^- -Werte bewirken, liess uns auch in der Gattung *Brassica* nach solchen Thiocyan Säureestern suchen. Wir haben zwar bis heute noch keine Anhaltspunkte für deren Auftreten in der Gattung *Brassica*, haben aber dabei gefunden, dass SCN^- , dessen reichliches Vorkommen in dieser Gattung⁵ schon bekannt war, in Wirklichkeit nicht präformiert ist, sondern enzymatisch aus einem glykosidischen Precursor gebildet wird⁶.

Pressäfte frischer Kohlblätter enthalten je nach Art, Standort, Jahreszeit etc. SCN^- -Mengen zwischen 2 und 50 mg%. Extrahiert man jedoch die unzerkleinerten Blätter mit kochendem Methanol — also unter Bedingungen, die zur Inaktivierung zelleigener Enzyme (in diesem Falle Myrosinase) führen — so ist die resultierende Extraktlösung frei von SCN^- . Versetzt man den in Wasser gelösten Trockenrückstand der methanolischen Extrakt-

*) Vorläufige Mitteilungen^{6, 8}.

lösung mit frischem Kohl-Presssaft oder mit Myrosinase, so kann nach kurzer Zeit die Bildung von freiem SCN^- konstatiert werden. Über andere hierbei gebildete Reaktionsprodukte wird unten berichtet werden. Für die quantitative Bestimmung der gebildeten SCN^- -Menge benützten wir die colorimetrische Methode von BARKER⁷. Wegen der Anwesenheit störender Begleitsubstanzen (Flavone, Gerbstoffe etc.) erwies es sich als vorteilhaft, SCN^- papierchromatographisch abzutrennen und nach Eluierung colorimetrisch zu bestimmen. Es zeigte sich, dass in den verschiedenen Brassica-Sorten beträchtliche Unterschiede der SCN^- -Werte bestehen und dass die jungen Blätter der Spross-Spitzen stets die höchsten SCN^- -Werte aufweisen.

Der glucosidische Precursor selbst, der nach seiner Herkunft Glucobrassicin⁸ benannt wurde, liess sich papierchromatographisch leicht nachweisen. Die entwickelten Papierstreifen wurden entweder mit gepufferter Myrosinase-Lösung und nach einstündiger Einwirkung des Enzyms mit Ferrinitratreagenz übersprüht oder mit ammoniakalischer AgNO_3 -Lösung oder mit einem Indolreagenz behandelt (siehe experimenteller Teil). Besonders empfindlich und spezifisch auf Glucobrassicin zeigte sich das Ferrinitrat-Reagenz, das unter den unten beschriebenen Bedingungen einen stark violetten Fleck mit Glucobrassicin bildet. Glucobrassicin wandert im Papierchromatogramm wie Glucotropaeolin. Es wurde in den Frischpflanzen folgender Arten nachgewiesen*): *Brassica oleracea* var. *sabauda* L., var. *gongyloides* L., var. *botrytis* L. subvar. *asparagoides* Lam., var. *gemmifera* DC., var. *botrytis* L. subvar. *cauliflora* DC., var. *acephala* DC., *Brassica Napus* L. var. *napobrassica* (L.) Peterm., *Brassica Rapa* L. var. *rapifera* Metzger, *Raphanus sativus* L. var. *radicula* Pers., Raph. sat. var. *niger* (Mill.) Pers., *Brassica oleracea capitata* L. In den Samen der genannten Arten fehlte Glucobrassicin völlig. Bemerkenswert ist das Vorkommen von Glucobrassicin auch ausserhalb der Gattung *Brassica* in *Raphanus sativus* Varietäten.

In einigen Arten (z.B. in den Blättern von *Brassica oleracea* var. *botrytis*, var. *gongyloides*, var. *acephala* und in der Wurzelrinde von *Brassica Napus*) wurde noch ein zweites Thioglucosid vom Indoltyp mit einem R_f -Wert über Glucobrassicin gefunden, aus dem durch Myrosinase ebenfalls SCN^- abgespalten wird, das aber in den Farbreaktionen mit Indolreagentien deutlich von Glucobrassicin abweicht. Über dieses Thioglucosid, dessen Isolierung inzwischen gelungen ist, wird an anderer Stelle berichtet werden.**)

*) Wir danken Herrn Prof. J. E. HÄRDH und Frl. Mag. L. KURKI vom Institut für Gartenbauwissenschaft der Universität Helsinki für wertvolle Hilfe bei der Beschaffung von Pflanzenmaterial.

***) Chemische und Spektrometrische Befunde deuten darauf hin, dass dieses Thioglucosid ein N_1 -subst. Derivat von Glucobrassicin ist.

Es muss hier hervorgehoben werden, dass der Nachweis von Glucobrassicin nur unter strikten Bedingungen, die jegliche Einwirkung von Enzymen oder hydrolytische Spaltung ausschliessen, gelingt. Dies mag der Grund dafür sein, dass bei den früheren Studien anderer Autoren, die mit Pressäften¹⁰ oder sonstwie unter ungünstigen Bedingungen gearbeitet hatten (z.B. langes Kochen unter Zusatz von Aluminiumsulfat)⁹, stets nur Spaltprodukte wie 3-Indolyacetonitril⁹ oder Reaktionsprodukte wie Ascorbigen¹⁰, jedoch nie der Precursor selbst beobachtet wurden.

Für die Isolierung von Glucobrassicin leisteten die papierchromatographischen Bestimmungsmethoden und die quantitative Bestimmung über enzymatisch gebildetes SCN⁻ wertvolle Hilfe. Sie ermöglichten die Auswahl des geeigneten Pflanzenmaterials und die Verfolgung der einzelnen Extraktions-, Anreicherungs- und Reinigungsschritte bis zum kristallinen Reinglucosid. Natürlich gelten auch für die Isolierungsoperationen die obengenannten Vorsichtsmassnahmen: Ausschluss jeglicher Enzymeinwirkung und Vermeidung hoher Temperaturen. Trotz aller Vorsichtsmassnahmen mussten während der etwa 6 Tage dauernden Operationen beträchtliche Verluste an Glucobrassicin mit in Kauf genommen werden. Die Isolierung, chemische Zusammensetzung und Eigenschaften von Glucobrassicin werden im experimentellen Teil eingehend beschrieben.

Aus frischgesammelten Blättern der Spross-Spitzen von *Brassica oleracea gongyloides*, *sabauda* oder *botrytis*, die bei 40–50°C getrocknet und mehrmals kurz mit 70% Methanol aufgeköcht oder durch unmittelbares Eintragen in kochendes Methanol extrahiert wurden, wurde Glucobrassicin nach verschiedenen Reinigungsschritten als Monohydrat in kurzen Nadeln oder Kristallblättchen in Form seines Tetramethylammoniumsalzes erhalten. Die durchschnittliche Ausbeute betrug etwa 300–500 mg pro 100 g getrocknete Blätter. Glucobrassicin ist leicht löslich in Wasser und in Methanol, schwerer in Äthanol oder Aceton und unlöslich in Chloroform, Äther oder Petroläther. Es schmilzt bei 140–142°C und zersetzt sich bei etwa 160°C. In der indolartig riechenden Schmelze ist SCN⁻ nachweisbar. Die optische Drehung $[\alpha]_D^{22} - 13.3^\circ$ ($c = 3.0$; in Wasser) liegt in der allgemeinen Grössenordnung anderer Senfölglycoside. Das UV-Spektrum entspricht dem eines 3-substituierten Indolderivates mit überlagertem Senfölglycosidspektrum (s. experimenteller Teil). Das IR-Spektrum weist grosse Ähnlichkeit mit den IR-Spektren anderer Senfölglycoside auf. Die Mikroanalyse des im Hochvakuum getrockneten, kristallwasserfreien Präparats gab Werte für C₂₀H₃₁N₃O₉S₂. Die in der ersten vorläufigen Mitteilung^{8b} angegebene Bruttoformel und Struktur für Glucobrassicin hatte sich auf die angegebene Struktur für Ascorbigen gestützt¹⁴, die auf Grund unserer neuen Ergebnisse einer Revision bedarf.

Durch Myrosinase wird Glucobrassicin unter rasch einsetzender Trübung

in Glucose, Sulfat, SCN^- und mehrere Indolderivate gespalten, wobei jedoch der sonst für die Senfölglicosidspaltung typisch scharfe Geschmack oder Geruch ausbleibt. Glucose wurde papierchromatographisch nachgewiesen, SO_4^- als $\text{BaSO}_4 \cdot \text{SCN}^-$ wurde papierchromatographisch und durch Farbreaktionen identifiziert und als schwerlösliches Sinapinium-Salz charakterisiert. Wegen des spontanen und quantitativen Zerfalls des intermediär gebildeten hypothetischen Senföls (3-Indolylmethylisothiocyanat) in SCN^- und Indolderivate — auf 1 Mol Glucobrassicin wurde nach enzymatischer Spaltung 1 Mol SCN^- gefunden — versagten hier die sonst für Senfölglicoside benützten Methoden der Strukturaufklärung, bei denen der als Isothiocyanat abgespaltene Seitenrest durch seine Thioharnstoffderivate charakterisiert wird¹¹.

Führt man die Spaltung mit Myrosinase bei pH 7 durch, so kann man neben SCN^- 3-Hydroxymethylindol nachweisen, die beide als Zerfallsprodukte des 3-Indolylmethylisothiocyanats aufgefasst werden können.

3,3'-Diindolylmethan und Formaldehyd, die ausserdem in der Reaktionsmischung gefunden wurden, sind Sekundärprodukte aus 3-Hydroxymethylindol. Den Verlauf dieser Reaktion hat THESING¹² beschrieben. — Eine weitere Reaktion gibt einen Hinweis auf die Bildung von 3-Hydroxymethylindol, das wir wegen der geringen uns zur Verfügung stehenden Mengen von Glucobrassicin als solches noch nicht isolieren konnten: Behandelt man äquimolare Mengen von Glucobrassicin und Ascorbinsäure bei pH 7 mit Myrosinase, so bleibt die normalerweise beobachtete Trübung aus. Aus der Glucose, Sulfat und SCN^- enthaltenden Reaktionsmischung, in der keine freie Ascorbinsäure mehr nachweisbar ist, lässt sich durch Ausschütteln mit Essigester ein Produkt erhalten, das identisch ist mit PROCHÁZKA's aus Kohlsaft isoliertem Ascorbigen¹³ und wie dieses ein kristallines rotes Pikrat und ein orangefarbenes Trinitrobenzol-Addukt bildet. Durch kurzes Erhitzen mit verdünnten Säuren kann aus diesem Produkt Ascorbinsäure wieder freigesetzt werden. Wie wir nun gefunden haben, lässt sich dieses, mit Ascorbigen identische Produkt, bequem und in guter Ausbeute durch Erwärmen von 3-Hydroxymethylindol mit Ascorbinsäure in wässriger Lösung oder durch Erhitzen einer Mischung aus Indol, Formaldehydlösung und Ascorbinsäure synthetisch gewinnen. Die von PROCHÁZKA et al.¹⁴ vorgeschlagene Formel, die in Ascorbigen 3-Indolylpropendiol ätherartig mit Ascorbinsäure gebunden sieht, kann somit nicht zutreffen. Im Ascorbigen muss in Wirklichkeit ein 3-Indolylmethylrest an Ascorbinsäure gebunden sein. Die Art der Bindung und die endgültige Struktur von Ascorbigen muss durch weitere Versuche erst geklärt werden.

Die Entstehung der oben beschriebenen Produkte, besonders von 3-Indolylacetonitril bei der enzymatischen Spaltung von Glucobrassicin, ist verständlich, wenn diesem Thioglycosid die Formel I (Abb. 1) zukommt.

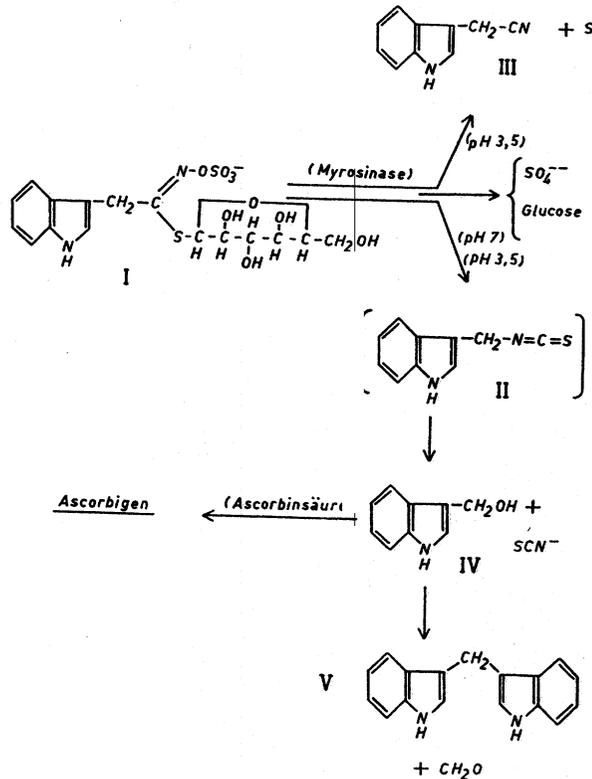


Abb. 1. Enzymatische Spaltung von Glucobrassicin und enzymatische Bildung von Ascorbigen

- I Glucobrassicin
- II Hypothetisches Intermediärprodukt, 3-Indolylmethylothiocyanat
- III 3-Indolylacetonitril
- IV 3-Hydroxymethylindol
- V 3,3'-Diindolylmethan

Die aus der enzymatischen Spaltung abgeleitete Struktur für das Glucobrassicin wird durch die Spaltungsprodukte, welche bei der sauren und alkalischen Hydrolyse entstehen, gestützt.

Einwirkung von konzentrierter kalter Salzsäure auf Glucobrassicin führt in üblicher Weise zur Bildung von Hydroxylamin¹⁵, das papierchromatographisch¹⁶ oder colorimetrisch nach Oxydation in HNO_2 ¹⁷ nachgewiesen wurde.

Bei der sauren und alkalischen Hydrolyse werden Glucose, Sulfat, H_2S und Schwefel abgespalten. Daneben treten wechselnde Mengen von SCN^- und verschiedener Indolderivate auf. Im alkalischen Hydrolysat konnten 3-Indolyllessigsäure neben 3-Indolylacetamid und 3-Indolylacetonitril sowie 3-Hydroxymethylindol, 3,3'-Diindolylmethan, 3-Indolaldehyd und Indol

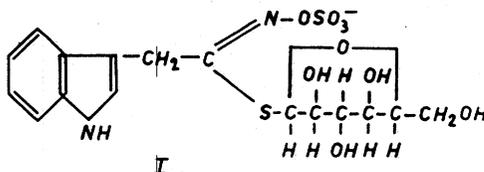
gefunden werden. Bei saurer Hydrolyse entstehen 3-Indolylacetonitril reichlich 3-Indolyllessigsäure sowie Spuren von 3-Indolylacetamid und Skatol. Beträchtliche Mengen von 3-Indolylacetonitril werden auch beim Kochen von Glucobrassicin in wässriger Lösung gebildet. Während Glucobrassicin als solches im Avena-Koleoptilzylinder-Test¹⁸ unwirksam ist wiesen alle Hydrolysate beträchtliche Wuchsstoff-Aktivität auf. Auch die durch Myrosinasespaltung bei pH 3,5 erhaltene Reaktionsmischung zeigt einen starken Wuchsstoff-Effekt, der etwa einer 50%igen Bildung von 3-Indolylacetonitril aus Glucobrassicin entsprach.*)

Die hydrolytische Spaltung von Senfölglycosiden über Nitrile in Säurer ist bekannt, ebenso ihr enzymatischer Zerfall in Nitrile bei fehlender Pufferung^{11, 19, 20, 21, 47}. Das in dieser Arbeit beschriebene Auftreten von 3-Indolylacetamid als Zwischenprodukt bei der Hydrolyse von Glucobrassicin ist ohne weiteres verständlich.

Einwirkung von Raney-Nickel¹⁵ auf Glucobrassicin in wässriger Lösung bei Zimmertemperatur führt rasch unter hydrogenolytischer Spaltung zu Tryptamin (Reaktionsweg a) und Skatol (Reaktionsweg b). Die gebildeten Produkte wurden durch Papierchromatographie bzw. Dünnschichtchromatographie identifiziert.

Für die enzymatisch und chemisch gebildeten Abbauprodukte 3-Indolylacetonitril, 3-Hydroxymethylindol, 3,3'-Diindolylmethan, Indol, Skatol und Schwefel erwies sich die Dünnschichtchromatographie als hervorragend geeignete Nachweismethode.

Die Auffindung von 3-Indolylacetonitril, 3-Indolylacetamid und 3-Indolyllessigsäure bestätigte die Struktur von Glucobrassicin als einem 3-Indolylacetothiohydroxamsäure-Derivat¹⁵. Aus ihm lassen sich sowohl die obengenannte Hydroxylaminbildung als auch die hydrolytische Bildung von den gefundenen Indolylverbindungen verstehen. Wie alle bisher bekannten Senfölglycoside¹¹ enthält auch Glucobrassicin Glucose als Zuckerrest, mit grosser Wahrscheinlichkeit in β -Glucopyranosidform. Glucobrassicin ist also S- β -D-1-(Glucopyranosyl)-3-Indolylacetothiohydroximyl-0-sulfat (Formel I).



Die Leichtigkeit, mit der aus Glucobrassicin auch unter hydrolytischen d.h. nicht-enzymatischen Bedingungen SCN^- abgespalten wird, gibt diesem

*) Die Wuchsstoffprüfungen wurden in diesem Laboratorium durch Mag. P. KARVONEN im modifizierten Koleoptilzylinder-Test nach Bonner durchgeführt, wofür auch an dieser Stelle gedankt sei.

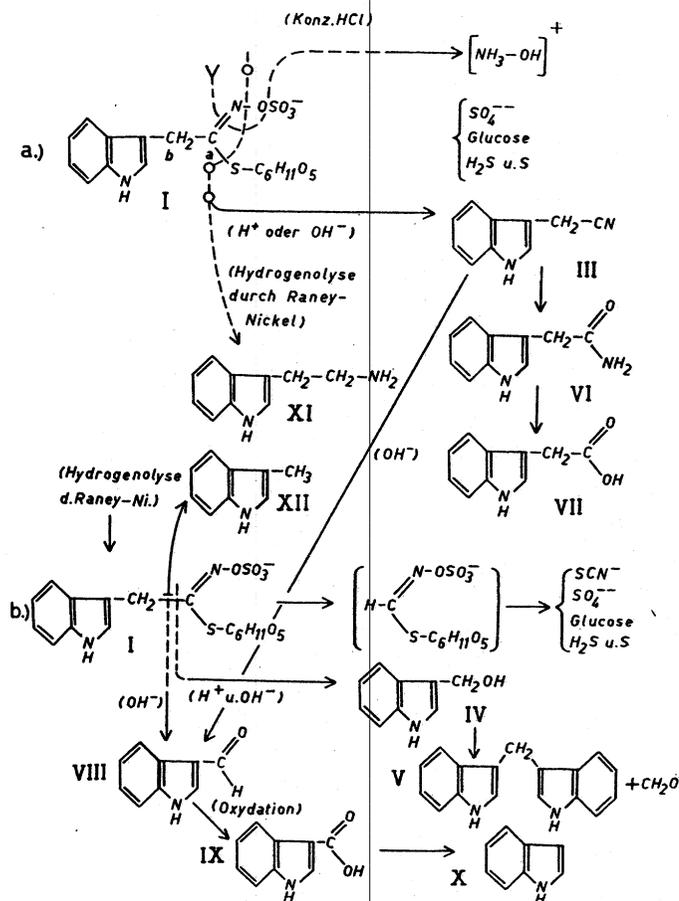


Abb. 2. Hydrolytische und hydrogenolytische Spaltung von Glucobrassicin

- | | |
|--------------------------|-----------------------|
| I—V wie in Abbildung 1 | IX 3-Indolcarbonsäure |
| VI 3-Indolylacetamid | X Indol |
| VII 3-Indolyllessigsäure | XI Tryptamin |
| VIII 3-Indolaldehyd | XII Skatol |

eine weitere Sonderstellung unter den Senfölglicosiden. Schon in wässriger Lösung bei Zimmertemperatur tritt dieser Zerfall des Glucobrassicins merklich ein, was auf eine sehr starke Lockerung der Bindungskräfte zwischen C_a und C_b deutet (s. Abb 2). Abbildung 3 bringt die unter verschiedenen Reaktionsbedingungen gebildete SCN⁻-Menge.

Die hydrolytischen, nicht enzymatischen Reaktionen verlaufen demnach in 2 Wegen:

- normale Senfölglicosid-Hydrolyse unter Erhaltung der C_a — C_b-Bindung, die im Prinzip der Hydrolyse einer Thiohydroxamsäure entspricht.¹⁵

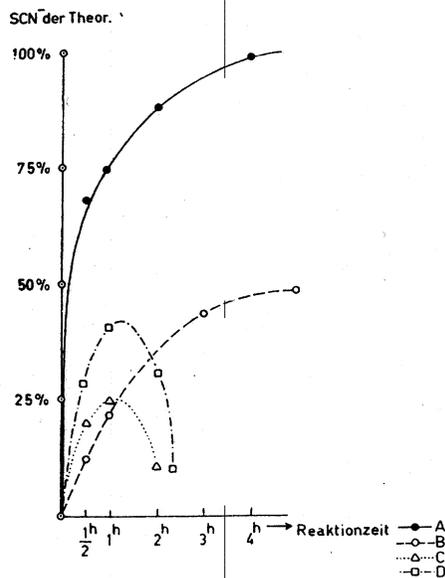
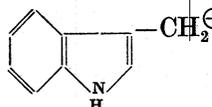


Abb. 3. Die Bildung von SCN^- aus Glucobrassicin unter verschiedenen Reaktionsbedingungen

- A = enzymatische Spaltung
 B = Erhitzen in Wasser
 C = » » n/10 HCl
 D = » » n/10 NaOH

b) Hydrolyse unter Spaltung der $C_a - C_b$ -Bindung, wobei nachträglich die abgetrennte Formothiohydroxamsäure-Gruppe weiter in SCN^- zerfällt.

Bestimmend für Reaktionsweg b) dürften wiederum die im 3-Indolylmethylrest herrschenden Mesomerieverhältnisse, die die Bildung eines

resonanzstabilisierten  Ions begünstigen, sein. Die Menge

des gefundenen SCN^- gibt ein ungefähres Bild für den Verlauf der Reaktionen und zeigt, dass sie unter den genannten hydrolytischen Bedingungen etwa zu 50% nach Reaktionsweg a) und b) verlaufen.

Diskussion

Die Existenz von Glucobrassicin und die Kenntnis seiner Spaltungsreaktionen und Abbauprodukte gestatten es nun, verschiedene Wirkstoffgruppen zusammenzufassen und als Reaktionsprodukte eines gemeinsamen Precursors, Glucobrassicin, zu behandeln.

Der potentielle SCN^- -Gehalt einiger Kohlarten ist genügend hoch, um die Befunde CHESNEY'S^{22, 23}, die Strumabildung bei Kaninchen nach einseitiger Kohlfütterung, auf der Basis von Glucobrassicin als Precursor zu erklären. Dass einige Forscher bei der Wiederholung dieser Versuche zu negativen Resultaten kamen, mag an der Verwendung glucobrassicin- und somit SCN^- -armer Kohlsorten gelegen haben. SCN^- blockiert bekanntlich die Jodidaufnahme der Schilddrüse und kann bei genügend langer und hoher Zufuhr Kropf hervorrufen^{7, 48}. Nach Kohlfütterung tritt eine Erhöhung des Serum- SCN^- -Gehalts ein. Auch der SCN^- -Gehalt der Milch nimmt nach Kohlfütterung beträchtlich zu, jedoch nur bis zu einem Grenzwert von etwa 1.0 mg%. Über die Konsequenzen von vielen Versuchsreihen, die inzwischen in diesem Laboratorium an einem grossen Tiermaterial durchgeführt wurden, für die Interpretierung der Resultate von CLEMENTS und WISHART wird an anderer Stelle berichtet werden.

Nachdem LINSER²⁴ 1939 heteroauxinartige Wuchsstoffe in Kohlarten in hoher Konzentration gefunden hatte, wurden diese Wirkstoffe durch verschiedene Arbeitsgruppen intensiv studiert²⁵. Diese Arbeiten gipfelten zunächst in der Isolierung von 3-Indolylacetonitril durch HENBEST *et al.*²⁶ Später wurden noch 3-Indolylcarbonsäure²⁷, 3-Indolaldehyd, 3-Indolylessigsäure²⁸, Skatylglyoxal²⁹ und 3-Indolylbrenztraubensäureoxim³⁰ als »Inhaltsstoffe« von Kohlarten beschrieben.

Auch ein Auxinprecursor³¹ wurde erwähnt jedoch ohne nähere Angaben über seine chemische Natur.

Bei Ascorbigen^{13, 32}, einem weiteren Stoff, der in Kohlarten gefunden wurde, handelt es sich ebenfalls um ein Indolderivat, in dem Ascorbinsäure gebunden und oxydationsbeständig vorliegt. Eine Beziehung von Ascorbigen zur übrigen Indolgruppe erschien von vornherein als wahrscheinlich, da aus Ascorbigen unter bestimmten Bedingungen 3-Indolylessigsäure erhalten werden konnte¹⁴, und da die Zufuhr von markiertem Tryptophan gleichzeitig zur Bildung von markiertem Ascorbigen und 3-Indolylacetonitril führte³³. Wie wir heute interpretieren können, war für die genannten Verbindungen Glucobrassicin der gemeinsame Precursor. Seine Existenz war schon früher einmal in Erwägung gezogen worden.^{34, 20b}

Die *Brassica*-Pflanzen zeichnen sich, wie LINSER *et al.* im Hinblick auf ihren hohen Wuchsstoffgehalt hervorgehoben haben, durch morphologische Eigentümlichkeiten aus, wie man sie ähnlich bei Pflanzen durch überdosierte Wuchsstoffgaben hervorrufen kann. Es ist bemerkenswert, dass gerade diese *Brassica*-Arten Glucobrassicin enthalten, das nach unseren Befunden die vorherrschende genuine Indolverbindung in Kohlarten ist. Weder 3-Indolylacetonitril noch Ascorbigen konnten in Methanol-Auszügen, die unter den obengenannten Vorsichtsmassnahmen bereitet wurden, auch nur in Spuren nachgewiesen werden. Nach unseren Befunden ist

Glucobrassicin der Precursor dieser Verbindungen und könnte demnach identisch mit einer früher postulierten Verbindung sein, die im Sinne Linsers ein »gebundener Wuchsstoff« ist und den *Brassica*-Pflanzen als »Wuchsstoff-Reserve-Pool« dient. In vielen früheren Arbeiten wurden qualitative und quantitative Angaben für 3-Indolylacetonitril und andere Indolderivate in Kohlarten beschrieben, die sich hauptsächlich auf papierchromatographische oder colorimetrische Methoden oder Wuchsstofftests stützten. Eine nachträgliche kritische Betrachtung der angewandten Methoden lässt unschwer erkennen, dass meistens unter Bedingungen gearbeitet wurde, die eine enzymatische oder hydrolytische Artefaktbildung begünstigten. Auch Ascorbigen ist, wie in dieser Arbeit bewiesen wurde, kein genuiner Naturstoff sondern ein enzymatisches Artefakt mit Glucobrassicin und Ascorbinsäure als Vorstufen. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang noch die Feststellung japanischer Autoren³⁶, dass Ascorbinsäure die Enzymaktivität von Myrosinase steigert. Unter diesem Aspekt verdient die Ascorbigenbildung besondere Beachtung.

Die Vitamin-C-Wirkung von Ascorbigen beim Menschen ist noch nicht bekannt.

Obwohl nun Glucobrassicin mit Sicherheit als Precursor von 3-Indolylacetonitril etc. angesehen werden kann, bleibt das eigentliche Wuchsstoffproblem der *Brassica*-Arten vorläufig noch offen, weil und solange man über die allgemeine Funktion und den Stoffwechsel von Glykosiden im pflanzlichen Organismus noch so wenig weiss.

Die Tatsache, dass Glucobrassicin in besonders grosser Menge in den Wachstumszonen auftritt, lässt an seine Beteiligung an Wachstumsprozessen denken. Über seine Funktion lassen sich 2 Hypothesen aufstellen, und es wäre wichtig, durch kritische Versuchsanordnungen die Gültigkeit der einen oder anderen Hypothese zu prüfen:

- a) Glucobrassicin wird in der Wachstumszone gebildet. Durch geeignete Enzyme wird aus Glucobrassicin der jeweilige Wuchsstoffbedarf freigesetzt. Glucobrassicin wäre demnach ein Auxinprecursor innerhalb eines Reserve-Pools.
- b) Glucobrassicin ist das Endglied einer Stoffwechselkette, die Heteroauxin nach Erfüllung seiner physiologischen Funktionen durchläuft. Der Wuchsstoff wird durch diese Bindung in einer inaktiven Form dem Stoffwechselgeschehen entzogen. Die grossen Glucobrassicin-Mengen in den Wachstumszonen würden auf einen sehr regen Heteroauxin-Umsatz deuten, der auch in den morphologischen Eigentümlichkeiten der *Brassica*-Gattung zum Ausdruck kommt. Glucobrassicin wäre nach dieser Hypothese einem sekundären Pflanzenstoff d.h. einem »Entgiftungsprodukt« gleichzustellen.

Da Glucobrassicin beim Erhitzen unter anderem in Indol und Skatol, zwei typische Geruchsträger, zerfällt, ist es sicher auch wesentlich an dem Zustandekommen des typischen Kohlaromas beim Kochprozess beteiligt und somit auch von diätetischer Bedeutung. Die Verfärbungen, die man bei gekochten und konservierten Kohlprodukten beobachten kann, dürften ebenfalls auf Glucobrassicin bzw. seine Spaltprodukte zurückzuführen sein.

Experimenteller Teil)*

Papierchromatographischer Nachweis von Glucobrassicin in Brassica oleracea-Sorten: Frisch gepflückte Blätter der Spross-Spitze von Kohlarten werden in die 5–10 fache Menge kochenden Methanols eingetragen und etwa 10 Minuten lang auf dem kochenden Wasserbad erhitzt. Anschliessend zerreibt man die Blätter im Mörser, presst aus und filtriert die Extraktlösung. 10–50 μ l-Portionen werden auf Whatman-Papier No. 1 aufgetragen. Dann wird auf-oder absteigend mit einem geeigneten Lösungsmittelsystem chromatographiert. Die getrockneten Papiere werden in Längsstreifen geschnitten, die dann einzeln mit verschiedenen Sprühreagentien zur Sichtbarmachung von Glucobrassicin behandelt werden:

- 1) Man besprüht mit Myrosinase-Lösung, die mit gleichem Volumen Citratpuffer pH 7 gemischt wurde, lässt den Streifen etwa 1 Stunde zwischen 2 Glasplatten liegen, trocknet ihn dann im Wärmeschrank und übersprüht ihn mit Ferrinitrat-Reagenz. An der Stelle von Glucobrassicin entsteht ein rotbrauner Fleck des $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ -Komplexes.
- 2) Farbreaktionen mit Indolreagentien:
 - a) p-Dimethylaminobenzaldehyd-HCl: gelb \rightarrow olive \rightarrow schmutzig grün-blau. Bei nachträglichem Übersprühen mit verdünnter NaNO_2 -Lösung tintenblaue Färbung.
 - b) Ferrinitrat- HNO_3 -Lösung: man besprüht den Streifen leicht, erwärmt ihn einige Minuten vorsichtig auf etwa 80°C oder lässt ihn ohne weitere Behandlung an der Luft entwickeln. Nach 30–60 Minuten erscheint Glucobrassicin als kräftig blauvioletter Fleck.
 - c) Zimtaldehyd-HCl: orangefarbener Fleck.
 - d) diazotiertes p-Nitranilin: brauner Fleck.

Papierchromatographische Analyse der Spaltprodukte von Glucobrassicin:

10–20 μ l-Portionen der im experimentellen Teil beschriebenen Ansätze werden aufgetragen und mit einem geeigneten Lösungsmittelsystem (meistens Isopropanol-Ammoniak) entwickelt. Die R_f -Werte sind in Tabelle I zusammengestellt.

Darstellung von Glucobrassicin:

107 g schonend bei 40–50°C getrocknete Blätter von *Brassica oleracea gongyloides* wurden 3 mal mit je 1 l 70%igem Methanol je 15 Minuten lang ausgekocht und aus gepresst. Die filtrierten Extraktlösungen wurden bei möglichst tiefer Temperatur in Vakuum auf etwa 500 ml eingeengt. Die Lösung wurde mit Wasser auf ein Volumen

*) Die Schmelzpunkte wurden mit einem Kofler-Mikroheiztisch bestimmt und sind korrigiert.

Die Elementaranalysen wurden im mikroanalytischen Laboratorium A. Bernhardt Mülheim a.d. Ruhr, durchgeführt.

von 1 l gebracht und durch Hyflo filtriert. Der Gehalt dieser Lösung, berechnet auf Grund von SCN⁻-Bildung, betrug $\sim 1,2$ g Glucobrassicin.

Die klarbraune Lösung wurde durch eine Säule (9 cm Ø) geschickt, in die man 1,5 kg Al₂O₃-sauer WOELM³⁷ gleichmässig eingeschlämmt hatte. Der Durchlauf war frei von Glucobrassicin und wurde verworfen. Nachdem die Säule mit 1 l Wasser gewaschen worden war, wurde mit 1% K₂SO₄-Lösung langsam eluiert. Das Eluat, das in Fraktionen zu 100 ml aufgefangen wurde, wurde laufend durch Myrosinasetest⁸ auf Glucobrassicin geprüft. Glucobrassicin erschien in den Fraktionen 16–20. Diese Fraktionen wurden schonend im Vakuum eingedampft und der Rückstand 3 mal mit warmen Methanol digeriert. Die filtrierte Methanollösung wurde i.V. zur Trockne gebracht.

Der Rückstand wurde in etwa 30 ml der oberen Phase einer Butanol-Äthanol-Wasser-Mischung 4:1:3 gelöst und auf eine Zelloosesäule von 6,5 cm Durchmesser und 36 cm Füllhöhe gebracht. Nachdem die Lösung eingesickert war, wurde mit der Oberphase des gleichen Gemischs entwickelt. 100 Fraktionen zu 25 ml wurden mit einem Fraktionskollektor aufgefangen. Von jeder Fraktion wurden 10 μ l auf Whatman N:o 4 aufgetragen. Die Streifen wurden mit Ferrinitrat-Reagenz besprüht. In den Fraktionen 10–15 war SCN⁻ zu finden, entstanden durch Zersetzung von Glucobrassicin während der Aufarbeitung. Bei kurzem Erwärmen der Streifen auf 100°C erschienen die Glucobrassicinflecken mit kräftiger violetter Färbung: Fraktionen 25–46. Diese Fraktionen wurden vereint und 5 mal im Scheidetrichter mit Wasser ausgeschüttelt.

Die wässrigen, Glucobrassicin enthaltenden Unterphasen liess man langsam eine kleine Säule passieren, die mit 30 ml Ambérlite IR 120 (200 mesh) in der Tetramethylammonium-Form gefüllt war. Anschliessend wurde mit 100 ml 50%igem Äthanol nachgewaschen. Perkolat und Waschflüssigkeit wurden im Vakuum schonend eingedampft. Der Rückstand wurde in wenig heissem 90% Äthanol aufgelöst. Nach kurzer Zeit schied sich Glucobrassicin in kurzen Nadeln als kristallwasserhaltiges Tetramethylammoniumsalz aus. Nach 2 maligem Umkristallisieren aus 90% Äthanol wurde es in glitzernden Blättchen erhalten. Aus der angewärmten Mutterlauge konnte durch vorsichtige Ätherzugabe weiteres Glucobrassicin erhalten werden. Gesamtausbeute 560 mg. In entsprechender Weise wurden aus 500 g frischen Blättern von *Brassica oleracea sabauda*, die in 5 l kochendes Methanol eingetragen und 15 Minuten lang gekocht wurden, 210 mg Glucobrassicin*) erhalten. 42 g getrocknete Blätter von *Brassica oleracea botrytis* gaben nach der ersten Voschrift 90 mg Glucobrassicin.

Fp. 140–412°C (korr.)* (Kofler-Mikroheiztisch), Zersetzung bei 160°C. $[\alpha]_D^{23} - 13,3^\circ$ (c = 3,0; in Wasser).

Kristallwasserbestimmung (Trocknung bei 110°C im Hochvakuum)

ber. für 1 Mol H ₂ O	3,09% H ₂ O
gef.	3,29% H ₂ O

Elementaranalyse für das kristallwasserfreie Präparat: C₂₀H₃₁N₃O₉S₂ (521,6)

ber. C	46,06	H	6,00	N	8,06	O	27,61	S	12,30
gef.	46,20		6,28		7,91		27,42		11,69

UV-Spektrum (in Wasser)

λ_{\max} 288, 280, 270–274 und 220 m μ ($\epsilon = 4800, 5795, 5685$ und 40700), λ_{\min} 286 und 252 m μ ($\epsilon = 4745$ und 3560)

*) Alle Angaben über das isolierte Glucobrassicin beziehen sich auf sein Tetramethylammonium-Salz.

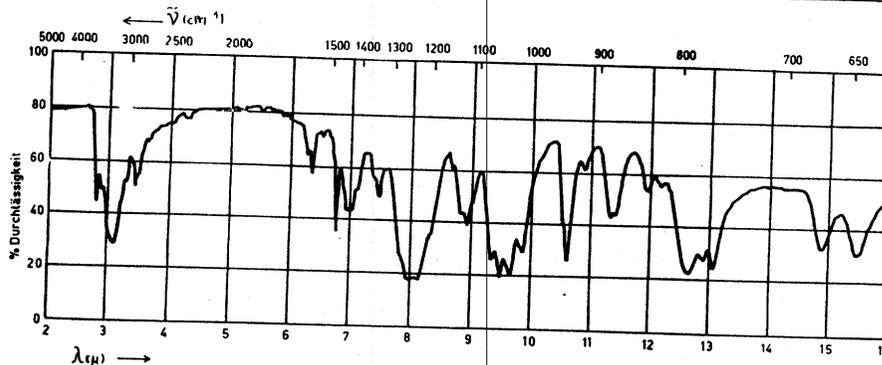


Abb. 4. IR-Spektrum von Glucobrassicin (Tetramethylammonium-Salz)
(1,5 mg gepresst in KBr)

Enzymatische Spaltung von Glucobrassicin (unter Pufferung):

50 mg Glucobrassicin wurden in 1 ml Citratpuffer pH 7 gelöst und mit einigen Tropfen Myrosinase³⁹ versetzt. Nach kurzer Zeit trat starke Trübung auf. Die Mischung wurde 4 Std. bei 37°C gehalten.

Nachweis der Spaltprodukte:

- a) Prüfung auf SO₄⁻ mit BaCl₂-Lösung: Fällung von BaSO₄, Heparprobe.
- b) Prüfung auf Glucose: 10 μl-Portionen wurden auf Whatman N:o 1-Papier aufgetragen, dazu verschiedene Kontrollzucker. PC in Butanol-Essigsäure-Wasser 4:1:5, Pyridin-Amylalkohol-Wasser 7:7:6 und Phenol-Wasser. Besprühen mit Anilinphthalat-Reagenz.

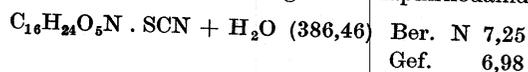
Der enzymatisch abgespaltene Zucker hatte in allen 3 Lösungsmitteln gleiche R_F-Werte wie die Glucose-Kontrolle.

- c) Prüfung auf SCN⁻: 10 μl Portionen wurden auf Whatman N:o 1 aufgetragen und in Butanol-Essigsäure-Wasser, Pyridin-Amylalkohol-Wasser 7:7:6 und in Iso-propanol-10% Ammoniaklösung 8:2 chromatographiert.

Nach dem Trocknen wurde mit Ferrinitrat-Reagenz besprüht. Zur quantitativen Bestimmung wurden 10 Flecken ausgeschnitten, mit Wasser eluiert und in üblicher Weise mit Fe-Reagenz colorimetrisch gemessen.

Charakterisierung von SCN⁻ als Sinapinrhodanid:

100 mg Glucobrassicin wurden wie ob enzymatisch gespalten. Die Lösung wurde nach 4 Std. kurz aufgeköcht, filtriert und auf ein kleines Volumen konzentriert. Zugabe von 50 mg Sinapinbisulfat.³⁸ Nach 1 Tag wurde das ausgeschiedene Sinapinrhodanid abfiltriert und nochmals aus Wasser umkristallisiert. Ausbeute: 38 mg Fp. 178°C. Keine Depression in Mischung mit Sinapinrhodanid.



Enzymatische Spaltung von Glucobrassicin bei pH 3,5:

50 mg Glucobrassicin wurden in 1 ml Citratpuffer pH 3,5 gelöst. Zugabe einiger Tropfen Myrosinase³⁹ Nach 12 Std. wurden 10 μl-Portionen aufgetragen.

Entwicklung mit Isopropanol-Ammoniak 8:2. Als Kontrolle lief synth. 3-Indolylacetonitril mit.

In beiden Ansätzen konnte 3-Indolylacetonitril mit EHRLICH'S Reagenz (blaubraune Färbung) und mit Ferrinitrat-Reagenz (braune Färbung) mit einem R_f -Wert von 0,82 neben Indolflecken, die mit der Lösungsmittelfront wanderten, nachgewiesen werden.

Nachweis von 3-Indolylacetonitril, 3,3'-Diindolylmethan und Schwefel durch Dünnschichtchromatographie (s. unten):

Hydrolytische Spaltung von Glucobrassicin:

10 mg Glucobrassicin wurden in a) 1 ml n/10 HCl-Lösung, b) 1 ml m/20 KH_2PO_4 -Lösung, c) 1 ml H_2O und d) 1 ml n/10 NaOH-Lösung gelöst und mehrere Stunden auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. In regelmässigen Abständen wurden 10 μl Portionen entnommen und auf Whatman N:o 4 Papier aufgetragen. Entwicklung mit Isopropanol-Ammoniak 8:2. Methode und R_f -Werte siehe Tabelle I.

Bei a) und d) waren bereits nach 15 Minuten 3-Indolylacetonitril nachweisbar, bei b) und c) nach etwa 1 Stunde.

Bei a) und d) waren mit zunehmender Reaktionsdauer Indolylacetamid und 3-Indolylessigsäure neben sonstigen Zersetzungsprodukten nachzuweisen, während bei b) und c) nach 2–4 Std. die Menge von 3-Indolylacetonitril stark zugenommen hatte. Bei a), b) und d) trat starke Dunkelfärbung und deutlicher Indol-Skatol-Geruch auf. In allen Ansätzen war SCN^- nachweisbar. (Zum Nachweis weiterer Spaltprodukte durch Dünnschichtchromatographie siehe unten.)

Die Bildung von H_2S wurde durch Bleinitratpapier nachgewiesen (bei a) und d)) nach vorheriger Ansäuerung.

Isolierung von 3,3'-Diindolylmethan nach alkalischer Hydrolyse von Glucobrassicin und Gewinnung eines 3-Indolylessigsäure-Konzentrats.

50 mg Glucobrassicin wurden in 1 ml n/10 NaOH-Lösung 2 Stunden lang im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen wurde vorsichtig mit Salzsäure angesäuert (H_2S -Entwicklung) und 3 mal mit Äther ausgeschüttelt.

Die Ätherphasen wurden 3 mal mit Na_2CO_3 -Lösung ausgeschüttelt. Die zurückbleibende Ätherphase wurde mit Na_2SO_4 anhydr. getrocknet, filtriert und eingedunstet. Es blieb eine kristalline Rohfraktion (3 mg) zurück, die bei 160°C schmolz und mit 3,3'-Diindolylmethan^{12, 40} keine Schmelzpunktsdepression ergab. Bei Dünnschichtchromatographie erwiesen sich die Kristalle als 3,3-Diindolylmethan, das noch durch Indolspuren und Spuren anderer Indolderivate verunreinigt war. Umkristallisation und Analyse waren wegen der kleinen Menge nicht möglich.

Die Na_2CO_3 -Phase wurde angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Die getrocknete Ätherphase wurde eingedampft. Der Rückstand erwies sich laut Papierchromatographie als eine Mischung aus etwa 2/3 3-Indolylessigsäure und 1/3 3-Indolylacetamid neben Spuren nicht identifizierter Indolderivate. Er war im Tomatentest⁴¹ stark aktiv und zeigte ähnliche Epinastieeffekte an den Blattachsen wie synth. Indolylessigsäure.

Nachweis von Formaldehyd als Sekundärprodukt bei der enzymatischen Spaltung:

50 mg Glucobrassicin wurden in 1 ml Citratpuffer pH 3,5 gelöst und mit einigen Tropfen Myrosinase versetzt. Diese Mischung befand sich im äusseren Raum einer CONWAY-Kammer, während der innere Teil mit einer gesättigten Dimedon-Lösung

halb gefüllt war. Die gut verschlossene CONWAY-Kammer wurde über Nacht bei 40°C gehalten. Am nächsten Morgen hatten sich im Innenraum lange, feine Nadeln ausgeschieden, die abfiltriert und durch Mikroschmelzpunkt als Dimedon-Formaldehyd-Derivat (Fp. 189°C) identifiziert wurden.

Das gleiche Derivat erhielt man, wenn 50 mg Glucobrassicin bei pH 7 mit Myrosinase zersetzt wurden und die Reaktionsmischung anschliessend der Destillation unterworfen wurde. Aus dem Destillat schied sich nach Zugabe von gesättigter Dimedonlösung nach einiger Zeit lange Nadeln aus, die bei 189°C schmolzen.

Wachstoffsbestimmungen mit Glucobrassicin-Hydrolysaten im Avena-Test:

0.01 molare Lösungen von Glucobrassicin in H₂O, n/10 NaOH und Myrosinase-Citratpuffer pH 3,5 wurden nach 4 stündigem Kochen bzw. 12 stündiger Einwirkungszeit und anschliessender Neutralisierung in einer Verdünnungsserie geprüft und mit entsprechenden Verdünnungsserien von 3-Indolylessigsäure und 3-Indolylacetonitril im Avena-Koleoptilzylindertest¹⁸ verglichen. Während alle durch Hitze- bzw. Enzymwirkung behandelten Ansätze mehr oder weniger starke Wachstoffsaktivitäten aufwiesen, war eine unbehandelte Glucobrassicin-Kontrolle ohne Wirkung.

Enzymatische Bildung von Ascorbigen aus Glucobrassicin und Ascorbinsäure:

120 mg Glucobrassicin und 36 mg Ascorbinsäure wurden in 10 ml Citratpuffer gelöst. Durch Zugabe von n/10 NaOH wurde das pH auf 7 eingestellt. Die Mischung wurde mit 0,2 ml Myrosinaselösung versetzt und 2 Stunden bei 37°C gehalten. Es trat eine kaum merkbare Trübung auf.

Von der Reaktionsmischung wurden 20 µl Portionen auf Filterpapier aufgetragen.

Nach Entwicklung mit Butanol-Essigsäure-Wasser 4:1:5 wurde in Längsstreifen geschnitten, die mit verschiedenen Sprühreagentien behandelt wurden: Anilinphthalat zeigte die Anwesenheit von Glucose.

Glucobrassicin und freie Ascorbinsäure waren nicht mehr nachzuweisen. Dagegen fand sich bei R_f 0,72 ein neuer Fleck, der mit KMnO₄-Lösung unter Entfärbung, mit AgNO₃-Lösung unter Braunfärbung reagierte. Mit EHRLICH'S Reagenz gab er einen kräftig violetten Fleck, mit Ferrinitrat-Reagenz einen rötlichen Fleck und mit Zimtaldehyd-Salzsäure einen orangefarbenen Fleck. Ausserdem war noch SCN⁻-nachzuweisen. Die gebildete Verbindung hatte gleiche R_f-Werte in Butanol-Essigsäure-Wasser und wassergesättigtem Butylacetat wie Ascorbigen.*)

Nach Ausschütteln mit Essigester und Abdampfen der mit Na₂SO₄ getrockneten Essigesterphase erhielt man einen amorphen, blassgelben Rückstand (48 mg), der ab 70°C sinterte.

UV-Spektrum (in Methanol): λ_{\max} 289, 280, 274–276 und 220 mµ ($\epsilon = 4880, 5665, 5350$ und 27200)
 λ_{\min} 287 und 244 mµ ($\epsilon = 4400$ und 1930)

IR-Spektrum (2 mg in 300 mg KBr): übereinstimmend mit IR-Spektrum des synthetischen Ascorbigens (s. unten).

Ascorbigen-Pikrat:

15 mg des erhaltenen Produkts und 9 mg Pikrinsäure wurden in 0,2 ml Äthanol unter gelindem Erwärmen gelöst. Bei langsamen Eindunsten im Exsiccator blieb ein

*) Wir danken Herrn Dr. Z. PROCHÁZKA für eine Vergleichsprobe seines Ascorbigen-Präparats.

ölicher roter Rückstand zurück, der beim Anreiben durchkristallisierte. Er wurde in wenig Aceton gelöst. Durch vorsichtige Zugabe von Petroläther erhielt man rotes, kristallines Ascorbigen-Pikrat. Ausbeute 18 mg. Fp. 126–128°C.

ber. für $C_{21}H_{16}N_4O_{13}$ (534,4)	C 47,19%	H 3,39%	N 10,49%
gef.	C 46,54%	H 3,44%	N 11,39%

Trinitrobenzol-Additionsverbindung:

15 mg Ascorbigen und 8 mg Trinitrobenzol wurden unter gelindem Erwärmen in 0,3 ml Äthanol gelöst. Die Lösung wurde im Exsiccator konzentriert. Durch vorsichtige Zugabe von Petroläther erhielt man die Additionsverbindung in schönen rechteckigen, orangefarbenen Tafeln. Ausbeute 19 mg. Fp. 151–153°C.

ber. für $C_{15}H_{17}NO_6 \cdot C_6H_3N_3O_6$ (520,4)	C 48,46%	H 3,88%	N 10,76%
gef.	C 47,33%	H 3,62%	N 11,10%

Synthese von Ascorbigen:

a) 3,5 g Ascorbinsäure wurden in 200 ml m/15 Phosphatpuffer gelöst. Die Lösung wurde durch Natronlauge auf pH7 gebracht (Lösung A). 2,95 g 3-Hydroxymethylindol, das nach THESING¹² aus 3-Indolaldehyd*) hergestellt wurde, wurden durch gelindes Erwärmen in 100 ml Phosphatpuffer pH7 gelöst (Lösung B). Lösung B wurde unmittelbar mit Lösung A zusammengebracht und die Mischung einige Minuten auf dem kochenden Wasserbad erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde die Mischung filtriert. Zur Entfernung von nicht umgesetztem 3-Hydroxymethylindol und gebildeten Nebenprodukten wurde das Filtrat 3 mal mit Äther ausgeschüttelt. Anschliessend wurde 5 mal mit Äthylacetat ausgeschüttelt. Die über Na_2SO_4 getrocknete Äthylacetat-Phase wurde filtriert und im Vakuum auf ein kleines Volumen eingengt. Zugabe von überschüssigem Petroläther brachte Ascorbigen als flockiges Pulver zur Fällung. Die Fällung wurde abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Ausbeute 4,1 g Ascorbigen als amorphes und schwach gelbliches Pulver.

0,25 g dieses Präparats wurden durch kontinuierliche Gegenstromverteilung⁴³ zwischen Äthylacetat und Wasser aufgetrennt**). Nach Entwicklung mit 3,02 l der Unterphase befand sich Ascorbigen in den Rohren 80–150. Der Inhalt der Rohre 100–150 wurde im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in wenig Äthylacetat gelöst. Durch Zugabe von überschüssigem Petroläther wurde Ascorbigen ausgefällt, das abgesaugt und im Hochvakuum getrocknet wurde. Ausbeute 0,150 g. Sinterung ab 70°C.

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{25} + 15,0^\circ$ ($c = 1,83$, in Methanol).

UV-Spektrum (in Methanol): λ_{max} 289, 280, 274–276 und 220 $m\mu$ ($\epsilon = 4900, 5680, 5350$ und 27300)
 λ_{min} 287 und 244 $m\mu$ ($\epsilon = 4400$ und 1950)

Mikroanalyse:

$C_{15}H_{15}NO_6$ (305,3)	ber.	C 59,01	H 4,95	N 4,59	O 31,45
$C_{15}H_{17}NO_6$ (307,3)	ber.	C 58,63	H 5,58	N 4,56	O 31,24
	gef.	58,70	5,51	4,14	31,88

*) 3-Indolaldehyd wurde uns freundlicherweise durch Herrn Dr. J. THESING, Fa. E. Merck A.G., Darmstadt, zur Verfügung gestellt, wofür wir auch an dieser Stelle herzlich danken.

**) Die Gegenstromverteilung wurde durch Dr. P. K. HIETALA durchgeführt, wofür auch an dieser Stelle gedankt sei.

Bei PROCHÁZKA et al.⁴⁴ für natürliches Ascorbigen angegebene Analysenwerte:

C	H	N
58,36	5,58	4,17
58,74	5,64	4,36
57,83	5,59	4,16

Pikrat: 30 mg synth. Ascorbigen und 18 mg Pikrinsäure wurden wie oben behandelt. Ausb. 39 mg. Fp. 126–128°C.

Trinitrobenzol-Additionsverbindung:

15 mg synth. Ascorbigen und 8 mg Trinitrobenzol wurden wie oben behandelt. Ausb. 17 mg. Fp. 151–153°C.

Synthese von Ascorbigen aus Indol, Formaldehyd und Ascorbinsäure:

Eine Mischung aus 2,35 g Indol, 3,6 g ascorbinsaures Natrium, 5 ml 40% Formaldehyd-Lösg. und 40 ml Citratpuffer pH 7 wurde 30 Min. gekocht. Zugabe von 100 ml Wasser. Nach Abkühlen der gelblichen Reaktionsmischung wurde 3 mal mit Äther, dann 6 mal mit Äthylacetat ausgeschüttelt. Die über Na₂SO₄ getrocknete Äthylacetatphase wurde im Vakuum auf ein kleines Volumen eingengt und mit überschüssigem Petroläther versetzt, wobei Ascorbigen als flockiger Niederschlag ausfiel. Absaugen, Nachwaschen mit Petroläther und Trocknen. Ausbeute 283 mg Rohprodukt, das sich papierchromatographisch wie Ascorbigen verhielt. Sinterung ab 70°C.

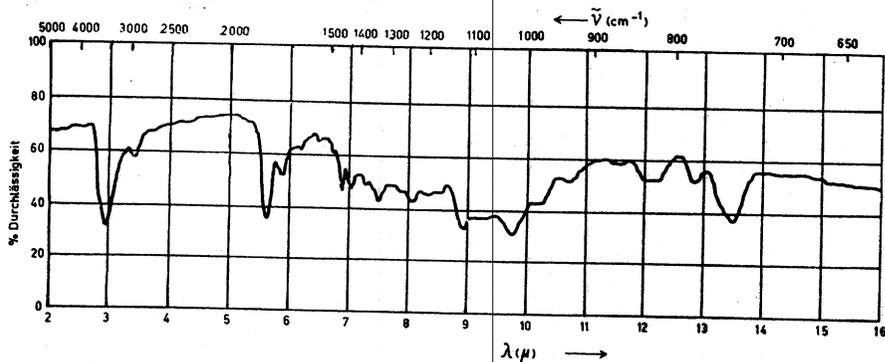


Abb. 5. IR-Spektrum von synthetischem Ascorbigen (gepresst in KBr).

Das IR-Spektrum von natürlichem Ascorbigen ist sehr ähnlich mit dem des synthetischen Präparats.

Hydroxylaminbildung aus Glucobrassicin durch Einwirkung von Salzsäure:

50 mg Glucobrassicin wurden in 0,5 ml 25% Salzsäure gelöst. Nach 12 Std. wurde auf einem Uhrglas im Vakuum über NaOH eingetrocknet. Ein Teil des Rückstands wurde zur papierchromatographischen Prüfung¹⁶ verwendet. Ein anderer Teil wurde nach BLOM¹⁷ mit Jod in Essigsäure behandelt und die gebildete salpetrige Säure mit GRIESS-LOSVAJ Reagenz nachgewiesen. Beide Methoden zeigten die Bildung von Hydroxylamin.

Hydrogenolytische Spaltung von Glucobrassicin durch Raney-Nickel nach ETTLINGER-LUNDEEN.¹⁵

20 mg Glucobrassicin wurden in 2 ml Wasser aufgelöst und eine kleine Spatelspitze Raney-Nickel zugegeben. Nach 2 stündigem Stehen bei Raumtemperatur wurde die Mischung filtriert. 30 µl Portionen der Lösung wurden papierchromatographisch untersucht (absteigend in Butanol-Essigsäure-Wasser 4:1:3). Durch Besprühen der einzelnen Streifen mit Ninhydrin (violetter Fleck), EHRLICH'S Reagenz (braunvioletter Fleck) und Ferrinitratreagenz (orange-gelber Fleck) wurde das Spaltprodukt, das wie synth. Tryptamin einen R_f -Wert 0,67 besass, als Tryptamin identifiziert. Auch in anderen Lösungsmittelsystemen hatte das Spaltprodukt gleiche R_f -Werte wie Tryptamin. In der Lösungsmittelfront war Skatol zu finden, das besser nach Ausschütteln der Reaktionslösung mit Äther durch Dünnschichtchromatographie, in der es sich durch seine charakteristische blaue Färbung leicht von Indol unterscheiden lässt, identifiziert werden konnte. Der Geruch der Reaktionslösung war typisch skatolartig.

Tabelle 1

Papierchromatographische R_f -Werte von Glucobrassicin und seinen verschiedenen Spaltprodukten in einigen Lösungsmittelsystemen. Zur Sichtbarmachung wurden die in der Tabelle aufgeführten Sprühreagentien verwendet.

Substanz	Sprühreagenz	R_f -Werte (absteigend)		
		System I	System II	System III
Glucobrassicin	ABCD	0,37	0,51	0,25
Glukotropaeolin	B	0,38	0,51	—
(Vergleichssubstanz)				
Ascorbigen*)	ABC	0,72	—	(0,37) (oval. Fleck)
SCN-	C	0,46	0,58	0,58
3-Indolylessigsäure	AC	über 0,9	0,59	0,33
3-Indolylacetamid	AC	—»—	—	0,72
3-Indolylacetonitril	AC	—»—	—	0,82
3-Indolaldehyd	AC	—»—	—	0,81
3,3'-Diindolylmethan	AC	—»—	—	0,90
3-Hydroxymethylindol	AC	—»—	—	0,79
3-Indolcarbonsäure	AC	—	—	0,24
Tryptamin	AC, Ninhydrin	0,67	—	0,70

*) Butylacetat-Wasser (aufsteigend) R_f 0,50

Sprühreagentien:

- A I) 1%ige Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd in Äthanol oder
 A II) » » » Zimtaldehyd » »
 (Papier besprühen, trocknen und in HCl-Atmosphäre hängen)
 B) 1%ige Lösung von AgNO₃ in Wasser (3 Teile) + konz. Ammoniaklösung
 (1 Teil)
 (Papier besprühen, 8 Minuten auf 110°C erhitzen, nochmals besprühen und erhitzen. Anschliessend Papier mit verdünnter HNO₃-Lösung auswaschen, mit Wasser nachwaschen und im Dunkeln trocknen.)

- C) 5%ige Lösung von Fe(NO₃)₃ · 9 H₂O in 1 N HNO₃-Lösung
(Papier besprühen, SCN⁻-Fleck markieren, dann vorsichtig erhitzen oder längere Zeit bei Zimmertemperatur bis zum Sichtbarwerden der Indol-derivate liegenlassen.)
- D) diazotiertes p-Nitranilin
- System I n-Butanol-Essigsäure-Wasser 4:1:3
System II Pyridin-Amylalkohol-Wasser 7:7:6
System III Isopropanol-10% Ammoniaklösung 8:2

Anwendung der Dünnschicht-Chromatographie⁴⁵ zur Analyse von Indolderivaten und Schwefel bei verschiedenen Spaltungsreaktionen von Glucobrassicin:

5,2 mg-Proben von Glucobrassicin wurden a) in 1 ml Myrosinase-Puffergemisch pH 7 oder b) pH 3,5 c) in 1 ml N/10 NaOH oder d) N/10 HCl-Lösung oder e) in 1 ml Wasser unter Zusatz von Raney-Nickel gelöst. a) und e) wurden 4 Stunden, b) 12 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten. c) und d) wurden 2 Stunden im kochenden Wasserbad erhitzt und nach dem Abkühlen neutralisiert. Die einzelnen Proben wurden mit 1–2 ml Äther oder Äthylacetat ausgeschüttelt. Die abgetrennten Oberphasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet. 10–100 µl-Portionen wurden in üblicher Weise zur Dünnschicht-Chromatographie aufgetragen. Nach 15–20 Minuten Entwicklung in Chloroform + 1% Äthanol wurden die Platten getrocknet, mit einer alkoholischen Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd besprüht, kurz erwärmt und dann in eine Glaskammer in HCl-Atmosphäre gebracht. Die Flecken von Indol (himbeerrot), Skatol (blau), 3-Hydroxymethylindol (ziegelrot), 3,3'-Diindolylmethan (ziegelrot) erschienen sehr rasch, während die von 3-Indolylacetonitril (taubenblau, bei höherer Konzentration ockerfarbenes Zentrum) erst nach einigen Stunden erschienen und nach etwa 12 Stunden ihre volle Farbintensität und charakteristische Färbung annahmen. Auch 3-Indolaldehyd (orangebrauner Fleck) benötigt längere Zeit zur Farbentwicklung. Schwefel wurde durch ammoniakalische AgNO₃-Lösung nach kurzem Erhitzen als schwarzbrauner Fleck erhalten.

Tabelle 2

Die R_f-Werte von verschiedenen Indolderivaten und Schwefel bei Dünnschicht-Chromatographie in Chloroform + 1% Äthanol. Kieselgel G⁴⁶ als Trägerschicht.

Substanz	nachgewiesen in Reaktion	R _f -Wert	Farbe
Indol	c)	0,66	himbeerrot
Skatol	d) e)	0,70	blau
3,3'-Diindolylmethan	a) b) c)	0,55	ziegelrot
3-Indolylacetonitril	b) c) d)	0,42	Rand taubenblau, Zentrum ocker
3-Indolaldehyd	c)	0,145	braunorange
3-Hydroxymethylindol	a) b) c)	0,095	ziegelrot
Schwefel	b) c) d)	0,75	braunschwarz

Zusammenfassung

Aus *Brassica oleracea sabauda*, *gongyloides* und *botrytis* wurde Glucobrassicin, ein neues Thioglucosid isoliert, das auch in den übrigen Kohlarten, in *Brassica Napus* und *Br. Rapa* sowie in *Raphanus sativus* vorkommt. Glucobrassicin, S- β -D-1-(Glucopyranosyl)-3-Indolylacetothiohydroximyl-0-sulfat, zerfällt enzymatisch bei pH 7 in SCN⁻, Glucose, Sulfat und 3-Hydroxymethylindol, das unter Formaldehydabspaltung 3,3'-Diindolylmethan neben weiteren, noch nicht identifizierten Indolderivaten bildet. Bei pH 3,5 wird neben den genannten Produkten reichlich 3-Indolylacetonitril und Schwefel gebildet. Durch Hydrolyse entstehen aus Glucobrassicin 3-Indolylacetonitril, 3-Indolylacetamid und 3-Indolylessigsäure sowie Indol, Skatol, 3-Indolaldehyd und eine Anzahl weiterer Indolderivate neben Glucose, Sulfat, SCN⁻, H₂S und Schwefel. Während Glucobrassicin als solches im Wuchsstofftest inaktiv ist, waren die so erhaltenen Reaktionsmischungen stark aktiv.

Hydrogenolytische Spaltung von Glucobrassicin durch Raney-Nickel führt zu Tryptamin und Skatol. In Anwesenheit von Ascorbinsäure wird bei der enzymatischen Spaltung von Glucobrassicin Ascorbigen gebildet. Ascorbigen konnte durch Reaktion von 3-Hydroxymethylindol bzw. von Indol und Formaldehyd mit Ascorbinsäure synthetisch erhalten werden. Diese Reaktionen und Tatsachen machen die Aufstellung einer neuen Ascorbigenformel notwendig.

Die Papierchromatographie und Dünnschichtchromatographie der Spaltprodukte von Glucobrassicin wird beschrieben. Für 3-Indolylacetonitril, 3-Hydroxymethylindol, 3,3'-Diindolylmethan, Indol und Skatol ist die Dünnschichtchromatographie hervorragend geeignet und die Methode der Wahl.

Die Beziehungen von Glucobrassicin als dem ersten »gebundenen Wuchsstoff« zu den früher gefundenen Wuchsstoffen und Indolderivaten in Kohlarten und die Zugehörigkeit von Glucobrassicin zu den *Brassica*-Faktoren werden besprochen.

Diese Arbeit ist ein Teil des Untersuchungsprojekts unter U. S. Public Law Nr. 480, 83rd Congress.

Summary

Glucobrassicin, a new thioglucoside, was isolated from *Brassica oleracea sabauda*, *gongyloides*, and *botrytis*. It also occurs in other cabbage species, in *Brassica Napus* and *Br. Rapa*, as well as in *Raphanus sativus*. Glucobrassicin, S- β -D-1-(glucopyranosyl)-3-indolylacetothiohydroximyl-0-sulphate, is en-

zymatically split at pH 7 into SCN^- , glucose, sulphate, and 3-hydroxymethylindole. The last one forms 3,3'-diindolylmethane by simultaneous splitting of formaldehyde. Some other not yet identified indole derivatives are also formed. At pH 3.5 a large amount of 3-indolylacetonitrile and sulphur are enzymatically formed in addition to the above products. 3-Indolylacetonitrile, 3-indolylacetamide, and 3-indolylacetic acid, as well as indole, skatole, 3-indolaldehyde, and a number of other indole derivatives besides glucose, sulphate, SCN^- , H_2S , and sulphur are formed by acid and alkaline hydrolysis. Whereas glucobrassicin is inactive in the auxin test, the reaction mixtures thus obtained were highly active.

Hydrogenolytic cleavage of glucobrassicin with Raney nickel leads to tryptamine and skatole. Ascorbigen is formed in the presence of ascorbic acid by the enzymatic cleavage of glucobrassicin. Synthetic ascorbigen could be obtained when 3-hydroxymethylindole or indole and formaldehyde, respectively, were heated in water with ascorbic acid. On the basis of these syntheses and the structure of glucobrassicin, ascorbigen cannot have the structure earlier proposed by other workers.

The paper chromatography and «Dünnschicht» chromatography of the degradation products of glucobrassicin are described. The «Dünnschicht» chromatography was found to be the most suitable method for the detection of 3-indolylacetonitrile, 3-hydroxymethylindole, 3,3'-diindolylmethane, indole, and skatole. The relationship of glucobrassicin as the first «bound growth substance» to the earlier found growth substances and indole derivatives in cabbage species as well as the fact that glucobrassicin belongs to the «*Brassica* factors» are discussed.

literatur

- 1) CLEMENTS, F. W. und WISHART, H. W., *Metabolism* 5 (1956) 623.
- 2) VIRTANEN, A. I., KREULA, M. und KIESVAARA, M., *Acta Chem. Scand.* 12 (1958) 580; 13 (1959) 1043.
- 3) ALTAMURA, M. R., LONG, L. und HASSELSTRÖM, T., *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 1847.
- 4) GMELIN, R. und VIRTANEN, A. I., *Acta Chem. Scand.* 13 (1959) 1474; *Suomen Kemistilehti B* 32 (1959) 236.
- 5) a) MICHAJLOVSKIJ, N. und LANGER, P., *Z. physiol. Chem.* 132 (1958) 26; 317 (1959) 30.
b) LANGER, P. und MICHAJLOVSKIJ, N. *ibid.* 312 (1958) 31.
- 6) GMELIN, R. und VIRTANEN, A. I., *Acta Chem. Scand.* 14 (1960) 507.
- 7) BARKER, H., *J. Amer. Med. Ass.* 106 (1936) 762.
- 8) a) GMELIN, R., SAARIVIRTA, M. und VIRTANEN, A. I., *Suomen Kemistilehti B* 33 (1960) 172.
b) GMELIN und VIRTANEN, A. I., *ibid.* B 34 (1961) 15.
- 9) LINSER H. und KIERMAYER O., *Biochim. biophys. Acta* 21 (1956) 382
- 10) PROCHÁZKA, Ž. und KOŘÍSTEK, S., *Coll. Czech. Chem. Comm.* 16 (1951) 65.
- 11) KJAER, A., in »Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe«, Ed. Zechmeister L., XVIII, Wien, Springer Verlag 1960, S. 122.
- 12) THESING, J., *Ber.* 87 (1954) 692.
- 13) PROCHÁZKA, Ž. und ŠANDA, V., *Coll. Czech. Chem. Comm.* 25 (1960) 270; 25 (1960) 1100.
- 14) PROCHÁZKA, Ž., ŠANDA, V. und ŠORM, F., *Coll. Czech. Chem. Comm.* 22 (1957) 654.
- 15) ETTLINGER, M. G. und LUNDEEN, A. J., *J. Am. Chem. Soc.* 78 (1956) 4172.
- 16) BREMNER, J. M., *Analyst* 79 (1954) 198.
- 17) BLOM, J., *Ber.* 59 (1927) 121.
- 18) BONNER, J., *J. gen. Physiol.* 17 (1933) 63.
- 19) CHALLENGER, F., »Aspects of the organic Chemistry of Sulphur«, London, Butterworth 1959, S. 115.
- 20) a) SCHULTZ, O. E. und GMELIN, R., *Arch. Pharm.* 287/59 (1954) 342; (b) 287/59 (1954) 404.
- 21) KJAER, A., THOMSEN, H. und HANSEN, S. E., *Acta Chem. Scand.* 14 (1960) 1226.
- 22) CHESNEY, A. M., CLAWSON, T. A. und WEBSTER, B., *Bull. John Hopkins Hosp.* 43 (1928) 261.
- 23) GREER, M. A., *Physiol. Rev.* 30 (1950) 513; *Am. J. Clinic. Nutrit.* 5 (1957) 440; *Bordens Rev. of Nutrit. Res.* 21 (1960) 61.
- 24) LINSER, H., *Planta* 29 (1939) 392.
- 25) Review-Arbeiten:
NITSCH, J. P., S. 3, BENTLEY, J. A., HOUSLEY, S. und BRITTON, G., S. 40, in »The Chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances«, Ed. Wain R. L. und Wightman, F., London, Butterworth 1956.
BENTLEY, J. A., *Annual Review of Plant Physiol.* 9 (1958) 47.
STOWE, B. B., in »Fortschritte der Chemie organ. Naturstoffe« XVII, Ed. Zechmeister L, Wien, Springer 1959, S. 248.

- 26) HENBEST, E. R., JONES, E. R. H. und SMITH, G. F., *J. Chem. Soc.* (1953) 3796.
- 27) JONES, E. R. H. und TAYLOR, W. C., *Nature* 179 (1957) 1138.
- 28) WELLER, L. E., WITTEWER, S. H. und SELL, H. M., *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 629.
- 29) POST, L. C., Dissertation, Utrecht, 1959.
- 30) AHMAD, A. und SPENCER, L. D., *Canad. J. Chem.* 38 (1960) 1625.
- 31) HOUSLEY, S. und BENTLEY, J. A., *J. exptl. Bot.* 7 (1956) 219.
- 32) PROCHÁZKA, Ž., *Rev. Czech. Med.* 1 (1955) 43.
- 33) KUTÁČEK, M., PROCHÁZKA, Ž. und GRÜNBERGER, D., *Nature* 187 (1960) 61.
- 34) GMELIN, R., Dissertation, Tübingen, 1954.
- 35) a) LINSENER, H., YOUSSEFF, E. und KIERMAYER, O., *Z. Lebensmittel-Unters. und Forschg.* 108 (1958) 358.
b) —»— KIERMAYER, O. und YOUSSEFF, E., *Planta* 52 (1958) 173.
- 36) NAGASHIMA, Z., und UCHIYAMA, M., *Bull. Agric. Soc. Jap.* 23 (1959) 555.
- 37) Herstellerfirma: M. Woelm, Eschwege, Deutschland.
- 38) GADAMER, J., *Arch. Pharm.* 235 (1897) 44; *Ber.* 30 (1897) 2327.
- 39) NEUBERG, C. und WAGNER, J., *Bioch. Z.* 174 (1926) 457.
- 40) LEEDE, E., *J. Am. Chem. Soc.* 81 (1959) 6023.
- 41) ZIMMERMAN P. W. und WILCOXON, F., *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 7 (1935) 209.
- 42) CONWAY, E. J., »Microdiffusion Analysis and Volumetric Error«, London, Crosby Lockwood & Son Ltd., 1947.
- 43) HIETALA, P. K., *Annal. Acad. Scient. Fenn. AII Chem.* 100 (1960).
- 44) PROCHÁZKA, Ž., ŠANDA, V. und ŠORM, F., *Coll. Czech. Chem. Comm.* 22 (1957) 333
- 45) STAHL, E., *Chem. Ztg.* 83 (1958) 323.
- 46) Herstellerfirma: E. Merck A.G., Darmstadt, Deutschland.
- 47) SCHWIMMER, S., *Acta Chem. Scand.* 14 (1960) 1439.
- 48) FIROUSEK, L., *Physiologia Bohemoslov.* 5 (1956) 316.

Annales Academiæ Scientiarum Fennicæ
Series A. II. Chemica

70.	ELORANTA, JORMA, The solvent effect in the hydrolysis of α -bromosubstituted lower aliphatic acids and their salts. (54 pp.) 1956	300:—
71.	VILKKI, PANU, Iodine in the Finnish diet and its relation to goitre incidence. (60 pp.) 1956	300:—
72.	TOIVONEN, HEIKKI, Über das Verhalten der endo-exo-isomeren Alkohole der bicyclo-[1.2.2]-heptanreihe gegen Salpetersäure. (49 pp.) 1956	250:—
73.	KOIVISTO, AULIS, The solvolysis of organic anions and the saponification of simple esters. (44 pp.) 1956	250:—
74.	PULKKINEN, ERKKI, Über die Dehydratation des α - und β -Fenchols. (86 pp.) 1956	400:—
75.	AEJMELEAUS, KAJ, Some aspects of the molecular fractionation of cellulose nitrate. (63 pp.) 1956	300:—
76.	PERILÄ, OLAVI, Saturated fatty acids of stem cells of birch (<i>Betula verrucosa</i>) and aspen (<i>Populus tremula</i>). (49 pp.) 1956	250:—
77.	AVELA, EERO, Untersuchungen an einigen 2, 3-disubstituierten Camphanderivaten. (84 pp.) 1956.....	350:—
78.	HIRSJÄRVI, PEKKA and TOMMILA, EERO, The infrared spectra of sulphonyl chlorides and sulphonic acid esters. (20 pp.) 1957	150:—
79.	ELLFOLK, NILS, Aspartase, a study on its nature and purification. (74 pp.) 1956	350:—
80.	PIHA, SAKARI, Studies on the blood regeneration during progressive reticulocytosis due to repeated bleedings. (99 pp.) 1956.....	350:—
81.	HIRSJÄRVI, PEKKA, The endo-exo-isomer ratio in alcohol mixtures resulting from reductions of some bicyclo-[1.2.2]-heptanones by methods commonly used to prepare these alcohols. (16 pp.) 1957	150:—
82.	af HÄLLSTRÖM, M., Thermodynamische Studie zum System Eis-unterkühltes Wasser. (25 pp.) 1957	175:—
83.	RENKONEN, OSSI, Über Glykoside aus Samen von <i>Strophanthus divaricatus</i> (Lour.) Hook et Arn. (72 pp.) 1957	350:—
84.	HIRSJÄRVI, PEKKA, The endo-exo-configurations of isofenchols and fenchols. (15 pp.) 1957	150:—
85.	PEKKARINEN, LAURI, The hydrolysis of alkyl hydrogen maleates and orthophthalates. The effect of the alcohol component and solvent. (31 pp.) 1957	200:—
86.	NORTIA, TEUVO, Magnetic and spectrophotometric studies on iron, cobalt, nickel and copper compounds of 8-hydroxyquinoline-5-sulphonic acid and 7-iodo-8-hydroxyquinoline-5-sulphonic acid (52 pp.) 1957	250:—
87.	UUSITALO, EINO, The thermodynamics of the formation of metal chelates of some 7-substituted 8-hydroxyquinoline-5-sulphonic acids. (62 pp.) 1957	300:—
88.	AALTIO, ERKKI, Investigations on the mode of combination of lignin in wood, with special reference to aspen (<i>Populus Tremula</i>) wood. (58 pp.) 1957	300:—
89.	af HÄLLSTRÖM, M., Zur Thermodynamik der Phasengleichgewichte. (28 pp.) 1958	150:—
90.	ENARI, TOR-MAGNUS, Studies on the uptake of cobalt and iron and their effect on the production of riboflavin by <i>Candida quilliermonoi</i> . (42 pp.) 1958	250:—

91. TOMMILA, EERO, PAAKKALA, ESKO, VIRTANEN, U. K., ERVA, AUVIKKI and VARILA, SIRKKA, The influence of the solvent on reaction velocity. XVII. The hydrolysis of benzyl chlorides in acetone-water and dioxan-water mixtures. (36 pp.) 1959	200:—
92. VOIPIO, AARNO, The kinetics of the decomposition of nitramide in aqueous solvent mixtures. (60 pp.) 1958	300:—
93. KENTTÄMAA, JOUKO, TOMMILA, EERO and MARTTI, MATTI, Some thermodynamic properties of the system <i>t</i> -butanol + water. (20 pp.) 1959	150:—
94. SALOMAA, EERO, Die Wasserabspaltung aus Menthol und α -Fenchol durch Erhitzen ihrer Kohlensäure-, Thiolkohlenensäure- und Thionkohlen-säuremethylester. (46 pp.) 1959	250:—
95. af HÄLLSTRÖM, M., Zur Thermodynamik der Gasreaktionen. (12 pp.) 1959	120:—
96. HALMEKOSKI, JAAKKO, A study of the chelate forming reaction between some phenolic compounds and anions formed by Mo ^{VI} , W ^{VI} , V ^V , Sn ^{IV} and B ^{III} . (64 pp.) 1959	300:—
97. UGGLA, ROLF, A study of the corrosion and passive states of zinc, lead and tin in the system water-oxygen-nitrogen-carbon dioxide. (74 pp.) 1959.....	400:—
98. LINKO, PEKKA, Water content and metabolism of wheat during short storage and germination. (69 pp.) 1960	400:—
99. HONKANEN, ERKKI, Darstellung verschiedener sterisch gehinderter Verbindungen mit lokalanästhetischer Wirkung. (80 pp.) 1960	400:—
100. HIETALA, PENTTI, A countercurrent distribution method for separation of chemical compounds. (69 pp.) 1960	400:—
101. PAAKKOLA, O., NÄSÄNEN, R., MERTEN, D. and MIETTINEN, J. K., Strontium 90 in finnish grass and cow's milk. (12 pp.) 1960	100:—
102. VUORINEN, ANTTI P. U. and MIETTINEN, JORMA K., Caesium 137 in finnish grass and cow's milk. (6 pp.) 1960	80:—
103. SALOMAA, PENTTI, Differentiation of structural effects in the acid-catalysed hydrolysis of acetals of formaldehyde. (22 pp.) 1961	200:—
104. NURMIKKO, VEIKKO and KÄRHÄ, ESKO, Nutritional requirements of lactic acid bacteria. I. The calcium requirements of streptococcus thermophilus strains (24 pp.) 1961	180:—
105. MATTINEN, VEIJO, Über den Einfluss der Methylsubstituenten bei der Bildung und der Hydrolyse der Semicarbazone von Ketonen mit Bicyclo-(2.2.1)-heptanon-(2)-gerüst, sowie Beiträge zur Darstellung dieser Ketone. (63 pp.) 1961	300:—